

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-105055

(P2004-105055A)

(43) 公開日 平成16年4月8日(2004.4.8)

(51) Int.Cl.⁷C 1 2 N 15/09
A O 1 K 67/027

F 1

C 1 2 N 15/00 Z N A A
A O 1 K 67/027

テーマコード (参考)

4 B O 2 4

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 24 頁)

(21) 出願番号 特願2002-270788 (P2002-270788)
(22) 出願日 平成14年9月17日 (2002.9.17)

特許法第30条第1項適用申請有り

(71) 出願人 000125369
学校法人東海大学
東京都渋谷区宮ヶ谷2丁目28番4号
(71) 出願人 597142376
宮田 敏男
神奈川県伊勢原市桜台2丁目16-25
エクセル伊勢原102号
(71) 出願人 597142387
黒川 清
東京都新宿区市谷柳町49市ヶ谷ヒルズ4
01
(74) 代理人 100102978
弁理士 清水 初志
(74) 代理人 100108774
弁理士 橋本 一憲

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 カルボニルストレス耐性トランスジェニック動物

(57) 【要約】

【課題】 カルボニルストレス耐性能を有するトランスジェニック動物の提供。

【解決手段】 ヒトグリオキサラーゼ I をコードするDNAが導入されたトランスジェニック動物が提供された。本発明のトランスジェニック動物は、カルボニルストレス耐性能を有しており、カルボニルストレスに対する生体適応機構の解明やそれに基づく創薬デザインの検討に有用である。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトグリオキサラーゼ I、またはヒトグリオキサラーゼ I と機能的に同等なタンパク質をコードする外来性の DNA を発現するトランスジェニック非ヒト動物であるカルボニルストレス耐性トランスジェニック動物。

【請求項 2】

ヒトグリオキサラーゼ I をコードする DNA が、配列番号：1 に記載の塩基配列のコード領域からなる請求項 1 に記載のカルボニルストレス耐性トランスジェニック動物。

【請求項 3】

非ヒト動物がマウスである請求項 1 に記載のカルボニルストレス耐性トランスジェニック動物。 10

【請求項 4】

非ヒト動物がラットである請求項 1 に記載のカルボニルストレス耐性トランスジェニック動物。

【請求項 5】

ヒトグリオキサラーゼ I、またはヒトグリオキサラーゼ I と機能的に同等なタンパク質をコードする DNA と、この DNA を動物において発現させることができるプロモーターを含むカルボニルストレス耐性トランスジェニック動物作製用組換え遺伝子。

【請求項 6】

次の工程を含む、カルボニルストレス耐性トランスジェニック動物の作製方法。 20

a) 動物の受精卵に請求項 5 に記載の組換え遺伝子を導入する工程

b) 工程 a) の受精卵から発生した初代トランスジェニック動物のうち導入した外来性遺伝子を保持した個体を選択する工程

【請求項 7】

更に次の工程 c) 及び d) を含む請求項 6 に記載のカルボニルストレス耐性トランスジェニック動物の作製方法。

c) 工程 b) で選択した個体と正常動物を交配させて外来性遺伝子をヘテロで保有する F₁ 動物を得る工程

d) 工程 c) で得た F₁ 動物同士を交配させて外来性遺伝子をホモで保有する F₂ 動物を得る工程 30

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、カルボニルストレスに耐性を有するトランスジェニック動物に関する。

【0002】

【従来の技術】

生体内において、糖・脂質由来のカルボニル化合物が蓄積し、非酵素的生化学反応によるタンパク質修飾が進んだ状態をカルボニルストレスと呼ぶ (Miyazawa T., Kishida N. Int. J. 55: 389-399 (1999))。カルボニル化合物は、生体内におけるメイラード反応を通じて老化、糖尿病、あるいは動脈硬化などの成人病との関連性が指摘されている。メイラード反応とは、グルコースなどの還元糖と、タンパク質のアミノ基との間に生じる非酵素的な糖化反応である。1912 年にメイラード (Maillard) がタンパク質と還元糖の混合物を加熱すると褐色に着色する現象に注目して報告した (Maillard L. C., Compt. Rend. Soc. Biol. 72: 599 (1912))。メイラード反応は、食品の加熱処理や貯蔵の間に生じる褐変、芳香成分の生成、呈味、タンパク質変性などに関与していることから、食品化学の分野で研究が進められてきた。 40

【0003】

ところが、1968 年ヘモグロビンの微小画分であるグリコシルヘモグロビン (HbA_{1c}) が生体内で同定され、さらにこれが糖尿病患者において増加することが判明した (文 50

献1/Rahbar S., Clin. Chim. Acta 22: 296 (1968))。これを契機に生体内におけるメイラード反応の意義並びに糖尿病合併症、動脈硬化などの成人病の発症、あるいは老化の進行との関係が注目されるようになってきた。たとえば、アマドリ化合物以降の反応で生成するピラリン、あるいはペントシジンに代表される後期段階生成物(Advanced glycation end Products、以下AGESと省略する)は、老化や糖尿病の指標になりうると考えられている。

【0004】

実際に慢性腎不全の患者においては、高血糖の有無に関わらず血中や組織中に反応性の高いカルボニル化合物やAGESが著しく蓄積している(文献2/Miyata T. et al., Kidney Int. 51: 1170-1181 (1997); 文献3/Miyata T. et al., J. Am. Soc. Nephrol. 7: 1198-1206 (1996); 文献4/Miyata T. et al., Kidney Int. 55: 389-399 (1999); 文献5/Miyata T. et al., J. Am. Soc. Nephrol., 9: 2349-2356 (1998))。これは腎不全においては、カルボニルストレスが存在しており、糖、あるいは脂質に由来するカルボニル化合物がタンパク質のアミノ基とメイラード反応を起こし、タンパク質を修飾するためであると考えられる(文献4/Miyata T. et al., Kidney Int. 55: 389-399 (1999))。

【0005】

近年、腎不全の合併症である透析アミロイドーシス、動脈硬化の発症進展におけるカルボニルストレスの関与が報告され(文献6/Miyata et al., J. Clin. Invest. 92: 1243-1252 (1993); 文献7/Miyata et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 2353-2358 (1996); 文献8/Miyata et al., FEBS Lett. 437: 24-28 (1998); 文献9/Miyata et al., FEBS Lett. 445: 202-206 (1999))、腎不全におけるカルボニルストレスの病態生理学的意義が注目されている。

したがって、生体内において生成されるカルボニル化合物を除去することによってカルボニルストレス状態を改善することは、腎不全におけるAGESの生成を抑制し、組織障害の軽減さらには合併症の進展の抑制につながると考えられる。

【0006】

更に腹膜透析の場合、血中の老廃物は腹膜を通して腹膜透析液中に排される。高浸透圧の腹膜透析液(グルコース、イコデキストリンまたはアミノ酸等を含有する)は、腎不全患者の血中に蓄積した反応性の高いカルボニル化合物を、腹膜を介して腹腔内の腹膜透析液中に集める作用がある。そのため腹膜透析液中のカルボニル化合物濃度は上昇し、カルボニルストレスの状態がもたられる。その結果、腹腔内のタンパク質がカルボニル修飾を受けて腹膜の機能が低下し、除水能の低下や腹膜硬化症の進展に関与すると考えられる(文献10/Miyata T. et al., Kidney Int. 58: 425-435 (2000); 文献11/Inagaki R. et al., FEBS Lett. 463: 260-264 (1999); 文献12/Ueda Y. et al., Kidney Int. 58: 2518-2524, 2000; 文献13/Combet S. et al., J. Am. Soc. Nephrol. 11: 717-728 (2000))。

【0007】

加えて腹膜透析患者においては、腹膜透析液中に含まれるグルコースによって腹腔内がカルボニルストレス状態となっていることが、腹膜の免疫組織学的検討から証明された(文献14/Yamada K. et al., Clin. Nephrol. 42: 354-361 (1994); 文献15/Nakayama M. et al., Kidney Int. 51: 182-186 (1997); 文献10/Mi

10

20

30

40

50

Yata T. et al., *Kidney Int.* 58: 425-435 (2000); 文献11/Ina γ i R. et al., *FEBS Lett.* 463: 260-264 (1999); 文献13/Combet S. et al., *J. Am. Soc. Nephrol.* 11: 717-728 (2000))。

【0008】

また、腹膜透析液中のグルコースは、熱滅菌により、腹膜に障害を与える種々の反応性カルボニル化合物が生成する(文献16/Nilsson-Thorell C. B. et al., *Perit. Dial. Int.* 13: 208-213 (1993) ; 文献17/Wieslander A. P. et al., *Perit. Dial. Int.* 15: 348-352 (1995) ; 文献18/Linden T. et al., *Perit. Dial. Int.* 18: 290-293 (1998))。このとき生成されるカルボニル化合物は、例えば、メチルグリオキサール(MGO)、グリオキサール(GO)、 β -デオキシグルコソン(β -DG)、ホルムアルデヒド、5-ヒドロキシメチルフルアルデヒド、アセトアルデヒド、あるいはフルフラール等である。これらのなかでジカルボニル化合物(GO、MGO、及び β -DG)は、反応性が高いことから、タンパク質修飾に関与し(文献19/Glomb M. A. and Monnier V. M., *J. Biol. Chem.* 276: 10017-10025 (1995) ; 文献20/Wellis-Knecht K. J. et al., *Biochemistry* 34: 3702-3709 (1995))、AGEsの腹膜中皮下及び血管への蓄積につながる(文献15/Nakayama M. et al., *Kidney Int.* 51: 182-186 (1997) ; 文献10/Miyata T. et al., *Kidney Int.* 58: 425-435 (2000))。

【0009】

また、腹膜の血管有効面積の 進、除水機能不全、血管拡張、血管新生を増幅する因子と考えられる一酸化窒素合成酵素、血管内皮増殖因子(VEGF)(文献21/Neufeld G. et al., *FASEB J.* 13: 9-22 (1999))、及びAGEsであるN^e-カルボキシメチルリジン(CML)(文献22/Ahmed M. U. et al., *J. Biol. Chem.* 261: 4889-4894 (1986))、及びヘントリジン(文献23/Sell D. R. and Monnier V. M., *J. Biol. Chem.* 264: 21597-21602 (1989))の共局在化が長期間腹膜透析患者の腹膜の免疫組織学的検討により明らかにされた(文献13/Combet S. et al., *J. Am. Soc. Nephrol.* 11: 717-728 (2000) ; 文献11/Ina γ i R. et al., *FEBS Letters* 463: 260-264 (1999))。

【0010】

また、培養腹膜中皮細胞及び内皮細胞をin vitroでMGOに曝露することによりVEGFのmRNA及びタンパク合成が増加する(文献11/Ina γ i R. et al., *FEBS Letter* 463: 260-264 (1999))。さらに、培養中皮細胞のグルコース分解反応性カルボニル化合物(glucose degradation reactive carbonyl compounds)への曝露は、細胞の成長、生存能、及び炎症性サイトカイン放出を阻害する(文献24/Witowski J. et al., *J. Am. Soc. Nephrol.* 12: 2434-2441 (2001))。

【0011】

そのため、腹膜透析液中の反応性カルボニル化合物を減少させるための方法が設計された(文献25/Miyata T. et al., *Kidney Int.* 61: 375-386, 2002)。例えば、カルボニル化合物の発生源であるグルコースに代え

10

20

30

40

50

アイコデキストリン (icodextrin) やアミノ酸を浸透圧物質として用いた透析液が提案されている。これらの新しいグルコースを含まない透析液 (文献26/Garcia-Lopez E. et al., *Perit. Dial. Int.* 20 (Suppl 5): 848-856 (2000); 文献27/Krediet R. T. et al., *Perit. Dial. Int.* 17: 35-41 (1997); 文献28/Faller B., *Kidney Int.* 56: 881-885 (1996)) は、カルボニル化合物濃度が低く (文献12/Ueda Y. et al., *Kidney Int.* 58: 2518-2524 (2000); 文献29/Schalkwijk C. G. et al., *Perit. Dial. Int.* 20: 796-798 (2000))、生体適合性の点で好ましい。新しいアイコデキストリン及びアミノ酸透析液では明らかにGO、MGO、3-DG及び総カルボニル化合物レベルが熱滅菌グルコース透析液と比較して低い。

10

【0012】

また、マルチコンパートメントバッグシステム (文献30/Topley N., *Perit. Dial. Int.* 17: 42-47 (1997); 文献31/Jorres A. et al., *Perit. Dial. Int.* 17 (Suppl 2): 842-846 (1997)) に充填された透析液のカルボニル化合物濃度は、通常の熱滅菌並びにその後の貯蔵にもかかわらず非常に低く (文献32/Laure C. et al., *Perit. Dial. Int.* 20 (Suppl 5): 828-832 (2000); 文献33/Tauer A. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280: 1408-1414 (2001))、その臨床的な有用性が研究者らにより確認されている (文献34/Capelli G. et al., *Adv. Perit. Dial.* 15: 238-242 (1999); 文献35/Rippe B. et al., *Kidney Int.* 59: 348-357 (2001); 文献36/Jones S. et al., *Kidney Int.* 59: 1529-1538 (2001))。

20

【0013】

グルコースを含まない透析液に代わる方法としてAGES形成を阻害することが知られている化合物を利用した方法が挙げられる。アミノグアニジン (文献37/Brownlee M. et al., *Science* 232: 1629-1632 (1986))、及びOPB-9195 (文献9/Miyata T. et al., *FEBS Lett.* 445: 202-206 (1999); 文献38/Miyata T. et al., *J. Am. Soc. Nephrol.* 11: 1719-1725 (2000)) 等の化合物は、カルボニル化合物をトラップすることによりタンパク質修飾を妨げる (文献9/Miyata T. et al., *FEBS Lett.* 445: 202-206 (1999); 文献5/Miyata T. et al., *J. Am. Soc. Nephrol.* 9: 2349-2356 (1998))。実際、OPB-9195またはアミノグアニジンの市販のグルコース透析液への添加によりGO、MGO及び3-DGレベルが劇的に減少し、AGESのペントシジン及びCML生成が減少する (文献38/Miyata T. et al., *J. Am. Soc. Nephrol.* 11: 1719-1725 (2000))。

30

40

【0014】

このように、カルボニルストレスを抑制して腎不全におけるAGESの生成に由来する組織障害を軽減し、さらに合併症の進展を抑制するための様々な手段の開発が試みられている。そして、かかるカルボニルストレス抑制に関する研究開発を促進するためには、環境ストレス (生活環境、食生活など) に起因するカルボニルストレスに対する耐性を有し、生体適応機構の解明やそれに基づく創薬デザインを検討でき得るモデル動物が必須である。

【0015】

50

- 【文献1】Rakbar S., Clin. Chim. Acta 22: 296 (1968)
- 【文献2】Miyata T. et al., Kidney Int. 51: 1170-1181 (1997)
- 【文献3】Miyata T. et al., J. Am. Soc. Nephrol. 7: 1198-1206 (1996)
- 【文献4】Miyata T. et al., Kidney Int. 55: 389-399 (1999)
- 【文献5】Miyata T. et al., J. Am. Soc. Nephrol. 9: 2349-2356 (1998)
- 【文献6】Miyata et al., J. Clin. Invest. 92: 1243-1252 (1993)
- 【文献7】Miyata et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 93: 2353-2358 (1996)
- 【文献8】Miyata et al., FEBS Lett. 437: 24-28 (1998)
- 【文献9】Miyata et al., FEBS Lett. 445: 202-206 (1999)
- 【文献10】Miyata T. et al., Kidney Int. 58: 425-435 (2000)
- 【文献11】Inagiri R. et al., FEBS Lett. 463: 260-264 (1999)
- 【文献12】Ueda Y. et al., Kidney Int. 58: 2518-2524, 2000
- 【文献13】Combet S. et al., J. Am. Soc. Nephrol. 11: 717-728 (2000)
- 【文献14】Yamada K. et al., Clin. Nephrol. 42: 354-361 (1994)
- 【文献15】Nakayama M. et al., Kidney Int. 51: 182-186 (1997)
- 【文献16】Nilsson-Thorell C. B. et al., Perit. Dial. Int. 13: 208-213 (1993)
- 【文献17】Wieslander A. P. et al., Perit. Dial. Int. 15: 348-352 (1995)
- 【文献18】Linden T. et al., Perit. Dial. Int. 18: 290-293 (1998)
- 【文献19】Glomb M. A. and Monnier V. M., J. Biol. Chem. 276: 10017-10025 (1995)
- 【文献20】Wells-Knecht K. J. et al., Biochemistry 34: 3702-3709 (1995)
- 【文献21】Neufeld G. et al., FASEB J. 13: 9-22 (1999)
- 【文献22】Ahmed M. U. et al., J. Biol. Chem. 261: 4889-4894 (1986)
- 【文献23】Sell D. R. and Monnier V. M., J. Biol. Chem. 264: 21597-21602 (1989)
- 【文献24】Witowski J. et al., J. Am. Soc. Nephrol. 12: 2434-2441 (2001)
- 【文献25】Miyata T. et al., Kidney Int. 61: 375-386, (2002)

10

20

30

40

50

- 【文献26】Garcia-Lopez E. et al., Perit. Dial. Int. 20 (Suppl 5): 848-856 (2000)
- 【文献27】Krediet R. T. et al., Perit. Dial. Int. 17: 35-41 (1997)
- 【文献28】Faller B., Kidney Int. 56: 881-885 (1996)
- 【文献29】Schalkwijk C. G. et al., Perit. Dial. Int. 20: 796-798 (2000)
- 【文献30】Topley N., Perit. Dial. Int. 17: 42-47 (1997)
- 【文献31】Jorres A. et al., Perit. Dial. Int. 17 (Suppl 2): 842-846 (1997)
- 【文献32】Laje C. et al., Perit. Dial. Int. 20 (Suppl 5): 828-832 (2000)
- 【文献33】Tauer A. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 280: 1408-1414 (2001)
- 【文献34】Capelli G. et al., Adv. Perit. Dial. 15: 238-242 (1999)
- 【文献35】Rippe B. et al., Kidney Int. 59: 348-357 (2001)
- 【文献36】Jones S. et al., Kidney Int. 59: 1529-2538 (2001)
- 【文献37】Brownlee M. et al., Science 232: 1629-1632 (1986)
- 【文献38】Miyata T. et al., J. Am. Soc. Nephrol. 11: 1719-1725 (2000)

【0016】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、カルボニルストレスに耐性を有するトランスジェニック動物に関する。

【0017】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、以前にカルボニルストレスの抑制に関する研究の一環として、グリオキサラーゼ系と呼ばれる解毒反応系に着目し、グリオキサラーゼI活性を備える酵素、及びカルボニル化合物還元剤を有効成分とするカルボニルストレス改善剤を開発した（WO 01/45733）。グリオキサラーゼ系は、グリオキサラーゼI（ラクトイルGSHリアーゼ）及びグリオキサラーゼII（ヒドロキシアシルGSHヒドラーゼ）の2つの酵素から成る解毒反応系である。この解毒反応により、解糖系で産生される生体に有毒なカルボニル化合物であるMGOがグルタチオン（GSH）の存在下で乳酸に転換される（Douglas K. T. et al., Andrew. Chem. 24: 31-44 (1985)）。

【0018】

グリオキサラーゼI活性を備える酵素としては、次のような由来の酵素が公知である。

乳動物の組織（Methods Enzymol. 90, 536-541, 1982, Methods Enzymol. 90, 542-546, 1982）

酵母（FEBB Lett. 85, 275-276, 1978, Biochem. J. 183, 23-30, 1979）

細菌（Biochem. Biophys. Res. Commun. 141, 993-999, 1986）

ヒト（J. Biol. Chem. 268, 11217-11221, 1993）

また、これらのグリオキサラーゼIを精製する方法も公知である。

【0019】

ラット肝臓細胞由来のグリオキサラーゼIは、分子量46,000で、23,000のサブユニットからなる2量体である。酵母由来のものは分子量32,000の単量体からなる(Marmstall et al., Biochem. J., 183: 23-30 (1979))。シュードモナス菌由来のグリオキサラーゼIは動物細胞由来のものに近いが、分子量20,000からなる単量体と報告されている(Rhee et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 141: 993-999 (1986))。

【0020】

ヒト由来のグリオキサラーゼIには3種のアイソザイムが存在する(Aronsson et al., Anal. Biochem., 92: 290-393 (1979))。しかしこれらのアイソザイムは、分子量、アミノ酸組成、抗原性などに大きな違いはなく、イオン交換クロマトグラフィーにより分離できることから、電気的な性質が異なるだけと考えられている。従ってこれら3種のアイソマーは2つの対立遺伝子に由来する2種のモノマーのホモダイマーならびにヘテロダイマーと考えられる(Kompf et al., Human Genetics 27: 141-143 (1975))。

【0021】

シュードモナス菌由来のグリオキサラーゼIについては、これをコードする遺伝子がクローニングされ、その全塩基配列が決定されている(Rhee et al., Agric. Biol. Chem., 52: 2243-2246 (1988))。また、ヒト由来グリオキサラーゼIについても、そのアミノ酸組成及び遺伝子配列が開示されている(J. Biol. Chem., 268: 11217-11221 (1993))。

【0022】

一方、最近、生体内におけるカルボニル化合物の消去・代謝系の仕組みが明らかになってきた。カルボニル化合物の消去には、いくつかの酵素や酵素経路の関与が報告されている。アルドース還元酵素、アルデヒドデヒドロゲナーゼ、あるいはグリオキサラーゼ経路等はこれに含まれる。これらのカルボニル化合物消去系の活性低下は、同時に多数のカルボニル化合物の上昇につながる。GSH及びNAD(P)Hなどのレドックス補酵素は、これらの経路の活性にとって重要な要素である(Thornalley et al., J. Endocrinol. Metab. 3: 149-166, 1996)。MGO、GOなどのカルボニル化合物は、GSHのチオール基と非酵素的に反応し、結果的にグリオキサラーゼにより代謝される。NAD(P)HはGSH還元酵素を活性化し、GSHレベルを上昇させる。すなわち細胞内レドックス機構の不均衡によるGSH、及びNAD(P)Hの低下によりカルボニル化合物消去系が阻害され、AGEsの蓄積につながる。実際に糖尿病患者の血液中GSHレベルは低下しており、カルボニル化合物であるMGOのレベルは上昇していることが報告されている。

【0023】

本発明者らは、MGOはGSHによってトラップされるが、更に、グリオキサラーゼI存在下で、より速やかに消去されることを見出した。また、GSH及びグリオキサラーゼI存在下においては、腹膜透析液中のMGO以外のカルボニル化合物、例えばGO、3-DGも速やかに消去されることを確認した(WO 01/45733)。

【0024】

そこで、本発明者らは、カルボニルストレスに対する生体適応機構の解明やそれに基づく創薬デザインの検討に有用な、カルボニルストレス耐性を有するトランスジェニック動物を開発するにあたり、このグリオキサラーゼIとそれをコードするDNAに着目した。本発明者らは、グリオキサラーゼIをコードするDNAの導入によって作製されたトランスジェニックマウスの組織が、各種のカルボニル化合物を消去することを確認した。すなわち、グリオキサラーゼIトランスジェニックマウスの心臓組織は、野生型に比べ、GO及びMGO溶液中のGO及びMGO濃度を有意に低下させた。

この観察結果に基づいて、グリオキサラーゼIをコードするDNAの導入によって、カル

10

20

30

40

50

ボニルストレスに対する生体適応機構の解明やそれに基づく創薬デザインの検討に有用な、カルボニルストレス耐性を有するトランスジェニック動物を作製できることを見出し、本発明を完成した。すなわち本発明は、以下のカルボニルストレス耐性モデル動物、このモデル動物の作製方法と用途に関する。すなわち本発明は、以下のカルボニルストレス耐性トランスジェニック動物に関する。

〔１〕ヒトグリオキサラーゼⅠ、またはヒトグリオキサラーゼⅠと機能的に同等なタンパク質をコードする外来性のＤＮＡを発現するトランスジェニック非ヒト動物であるカルボニルストレス耐性トランスジェニック動物。

〔２〕ヒトグリオキサラーゼⅠをコードするＤＮＡが、配列番号：１に記載の塩基配列のコード領域からなる〔１〕に記載のカルボニルストレス耐性トランスジェニック動物。

10

〔３〕非ヒト動物がマウスである〔１〕に記載のカルボニルストレス耐性トランスジェニック動物。

〔４〕非ヒト動物がラットである〔１〕に記載のカルボニルストレス耐性トランスジェニック動物。

〔５〕ヒトグリオキサラーゼⅠ、またはヒトグリオキサラーゼⅠと機能的に同等なタンパク質をコードするＤＮＡと、このＤＮＡを動物において発現させることができるプロモーターを含むカルボニルストレス耐性トランスジェニック動物作製用組換え遺伝子。

〔６〕次の工程を含む、カルボニルストレス耐性トランスジェニック動物の作製方法。

α) 動物の受精卵に〔５〕に記載の組み換え遺伝子を導入する工程

β) 工程α)の受精卵から発生した初代トランスジェニック動物のうち導入した外来性遺伝子を保持した個体を選択する工程

20

〔７〕更に次の工程γ)及びδ)を含む〔６〕に記載のカルボニルストレス耐性トランスジェニック動物の作製方法。

γ) 工程β)で選択した個体と正常動物を交配させて外来性遺伝子をヘテロで保有するＦ１動物を得る工程

δ) 工程γ)で得たＦ１動物同士を交配させて外来性遺伝子をホモで保有するＦ２動物を得る工程

【００２５】

本発明において、ヒトグリオキサラーゼⅠとは、配列番号：１に示す塩基配列を持つＤＮＡによってコードされるタンパク質である。そのアミノ酸配列を配列番号：２に示す。本発明のトランスジェニック動物は、ヒトグリオキサラーゼⅠのみならず、ヒトグリオキサラーゼⅠと生物学的に同等なタンパク質をコードするＤＮＡを導入したものであることができる。このようなタンパク質としては、たとえば他の種におけるグリオキサラーゼⅠのホモログを示すことができる。グリオキサラーゼⅠのホモログには、たとえば酵母由来、ラット、シュードモナス菌由来のものなどが明らかにされている。

30

【００２６】

また、一般に、真核生物の遺伝子はヒトインターフェロン遺伝子で知られているように多形現象を示すことが多い。この多形現象によって、アミノ酸配列に１個あるいはそれ以上のアミノ酸の置換を生じて、通常タンパク質の活性は維持される。また一般に、１個または数個のアミノ酸の改変では、タンパク質の活性は維持される場合が多いことが知られている。従って、配列番号：２に示されるアミノ酸配列を人工的に改変したアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子は、該タンパク質がカルボニルストレス耐性をもたらす限り、すべて本発明に利用することができる。以下、ヒト、酵母、ラット、あるいはマウスに由来するグリオキサラーゼⅠと、その生物学的に同等な機能を有するタンパク質を総称してグリオキサラーゼ類と記載する。なおグリオキサラーゼ類としてマウスに由来するグリオキサラーゼⅠをコードするＤＮＡをマウスに導入する場合であっても、人為的に導入したマウスに由来するＤＮＡは外来性のＤＮＡである。しかしながら、本発明によるトランスジェニック動物をカルボニルストレス耐性のモデル動物として、ヒトにおける治療剤に有用な化合物のスクリーニングを行うには、ヒトグリオキサラーゼⅠのＤＮＡを用いるのが有利である。トランスジェニック動物の体内でヒトグリオキサラーゼⅠに対

40

50

する影響を、より忠実に反映できる可能性が期待できるためである。

【0027】

また、アミノ酸に対するコドンはそれ自体公知であり、その選択も任意でよく、例えば利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して常法に従い決定できる (G r a n t h a m R. e t a l., N u c l e i c A c i d S R e s. 9: 143 (1981))。従って、コドンの縮重を考慮して、DNAを適宜改変したものもまた本発明のDNAに含まれる。さらに、これら核酸配列のコドンの一部改変は、常法に従い、所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドからなるプライマーを利用した部位特異的変位導入法 (M a r k D. F. e t a l., P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U. S. A. 81: 5662 (1984)) 等に従うことができる。

10

【0028】

更に、配列番号：1に記載の塩基配列を含むDNAとハイブリダイズすることができ、かつそのDNAによってコードされるタンパク質がカルボニルストレス耐性をもたらす限り、そのDNAは本発明によるDNAに含まれる。ストリンジェントな条件下で特定配列にハイブリダイズすることができる配列は、特定配列がコードするタンパク質と類似した活性を持つものが多いと考えられる。ストリンジェントな条件とは、通常「1×SSC、0.1% SDS、37℃」程度、より厳しい条件としては「0.5×SSC、0.1% SDS、42℃」程度、さらに厳しい条件として「0.1×SSC、0.1% SDS、55℃」程度を示すことができる。加えて、本発明におけるグリオキサラーゼ類をコードするDNAは、トランスジェニック動物にカルボニルストレス耐性をもたらす限り、その断片であることができる。

20

【0029】

本発明によるカルボニルストレス耐性トランスジェニック動物は、公知のトランスジェニック動物の作製方法によって得ることができる。トランスジェニック動物は、たとえば「発生工学実験マニュアル」(野村達次監修、勝木元也編、講談社、1989年)や、「新生化学実験講座・動物実験法」(日本生化学学会編、東京化学同人、1991年)などに従って作製される。以下に、一般的なトランスジェニック動物の作製プロトコールについて述べる。

【0030】

本発明においてトランスジェニック動物の作成に用いられるグリオキサラーゼ類をコードするDNAは、本明細書に開示した塩基配列に基づいて公知の方法により得ることができる。たとえば、本明細書で示したDNA配列に基づいて作製した合成オリゴヌクレオチドをプローブとして、公知の手法で作製されたヒト細胞のcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、グリオキサラーゼ類をコードするcDNAの単離が可能である。またこのcDNAライブラリーを鋳型として、配列番号：1に示した塩基配列に基づいて設定したプライマーを用いてPCRを行うことによって、グリオキサラーゼ類をコードするDNAを増幅することができる。増幅生成物は、公知の方法に基づいてクローニングする。

30

【0031】

グリオキサラーゼ類をコードするDNAは、この遺伝子を導入すべき動物の細胞において発現可能なプロモーターに連結した組み換え遺伝子コンストラクトとするのが有利である。本発明の組み換え遺伝子コンストラクトは、適当な宿主を利用してクローニング可能なベクターに、前記グリオキサラーゼ類をコードするDNAと、その上流にプロモーターとを挿入し、クローニングすることによって構築することができる。本発明に利用することができるプロモーターとしては、マウスやラットなど、幅広い脊椎動物で外来遺伝子の発現を誘導できるニフトリβアクチン・プロモーターを示すことができる。

40

【0032】

また、外来遺伝子の発現を増強するために、エンハンサーを組み合わせることができる。たとえば、CMVに由来するエンハンサーは、乳動物における外来遺伝子の発現を増強することが知られている。

50

これらの遺伝子から構成される組み換え遺伝子コンストラクトの構築にあたり、エンハンサーとプロモーターを備え、更にその下流に外来遺伝子挿入用のマルチクローニングサイトを配置したベクターを用いることができる。このような構造を持つベクターは、たとえばPCAGGS (Niwa H, Yamamura K and Miyazaki J (1991) Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. Gene 108, 193-200.)等をもとに実施例に示すような方法によって構築することができる。このベクターは、マルチクローニングサイトの下流にウサギβグロビン・ターミネーターが配置されており、挿入された外来遺伝子の発現効率の向上に貢献する。

10

【0033】

適当な制限酵素によって前記ベクターから切り出した組み換え遺伝子コンストラクトは、十分に精製されたトランスジェニック動物の作成に用いられる。トランスジェニック動物は、未受精卵、受精卵、精子及びその始原細胞を含む芽細胞などに、前記コンストラクトを導入することによって作成される。コンストラクトを導入する細胞としては、非ヒト哺乳動物の発生における発生の段階、より具体的には単細胞あるいは受精卵細胞の段階で、通常8細胞期以前のもものが利用される。コンストラクトの導入方法としては、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAE-デキストラン法等が公知である。さらに、こうして得られた形質転換細胞を上述の芽細胞と融合させることによりトランスジェニック動物を作成することもできる。

20

【0034】

コンストラクトを導入する細胞は、トランスジェニック動物の作成が可能なあらゆる非ヒト脊椎動物に由来する細胞であることができる。具体的には、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、イヌ、あるいはネコ等の細胞を利用することができる。たとえばマウスにおいては、排卵誘発剤を投与したメスのマウスに正常なオスのマウスを交配させることにより、コンストラクトの導入が可能な受精卵を回収することができる。マウス受精卵では、一般に雄性前核へのマイクロインジェクションによりコンストラクトが導入される。コンストラクトを導入した細胞は、体外での一晩程度の培養の後、導入に成功したと思われるものが代理母の卵管に移植され、トランスジェニックキメラ動物が誕生する。代理母には、精管を切断したオスと交配させて偽妊娠状態としたメスが利用される。

30

【0035】

生まれたトランスジェニックキメラ動物は、その体細胞の遺伝子を解析することによって、ゲノムに外来遺伝子(グリオキサラゼ類をコードするDNA)が組み込まれていることを確認した上で、F1動物の誕生のために正常な動物と交配させる。このとき、望ましくは、より多くのコピー数を持つ個体を選択するようにする。一般にコンストラクトとして導入した外来性のDNAは、ゲノムの同一の部分に複数コピーが直列に組み込まれる。通常はこの組み込みコピー数が多いほど、多量の遺伝子発現につながり、より明瞭な発現型が期待できるためである。体細胞ゲノムにおいて、外来遺伝子(グリオキサラゼ類をコードするDNA)が正しい方向で組み込まれていることは、コンストラクトに特異的なプライマーを用いたPCRによって確認することができる。また、ドットブロット法によって、コピー数の相対的な比較が可能である。

40

【0036】

この交配の結果誕生するF1動物の中で、体細胞に外来遺伝子(グリオキサラゼ類をコードするDNA)を備えるものは、ヘテロサイゴート(heterozygote)ながら生殖細胞に外来遺伝子(グリオキサラゼ類をコードするDNA)を伝えることができるトランスジェニック動物である。したがって、F1動物の中から体細胞に外来遺伝子(グリオキサラゼ類をコードするDNA)を保持するものを選び、これらを両親とするF2動物を誕生させることができるれば、外来遺伝子(グリオキサラゼ類をコードするDNA

50

A) をホモで保持するホモサイゴート動物 (homozygote animal) が F2 動物として得られる。

【0037】

本発明のカルボニルストレス耐性トランスジェニック動物には、外来性のグリオキサラーゼ類の DNA を発現するものである限り、これらトランスジェニック動物のいずれの世代であっても、利用することができる。たとえば、グリオキサラーゼ類の DNA をヘテロで保持するトランスジェニック動物であっても、この外来性のグリオキサラーゼ類が発現すれば、カルボニルストレス耐性トランスジェニック動物として有用である。

【0038】

トランスジェニック動物がカルボニルストレス耐性を呈していることは、次のような指標を観察することによって確認することができる。たとえば、トランスジェニック動物の臓器組織のライセートとカルボニル化合物溶液を in vitro でインキュベーションし、カルボニル化合物の濃度変化を観察し、その増減によってカルボニルストレス耐性を確認することができる。

【0039】

本発明のカルボニルストレス耐性トランスジェニック動物のカルボニル化合物消去効果は、トランスジェニック動物の組織とカルボニル化合物溶液のインキュベーションにより確認することができる。カルボニル化合物としては、GO、MGO、及び 3 DG 等を指標とすることができる。

【0040】

これらのカルボニル化合物は、実施例に示すように逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 等を用いて容易に測定することができる (Miyata T. et al., Kidney Int. 58: 425-435 (2000))。あるいは、2, 4-ジニトロフェニルヒドラジン (2, 4-DNPH) を酸性下でカルボニル化合物と反応させ、生成する発色生成物を 360 nm における吸光度で測定することもできる。なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

【0041】

カルボニルストレス耐性トランスジェニック動物は、投与された毒性を有する種々のカルボニル化合物を迅速に消去する能力を有している。従って、本発明のトランスジェニック動物は、カルボニルストレスを抑制して腎不全における AGEs の生成に由来する組織障害を軽減し、さらに合併症の進展を抑制するための様々な手段の開発のための、環境ストレス (生活環境、食生活など) に起因するカルボニルストレスに対する耐性を有し、生体適応機構の解明やそれに基づく創薬デザインを検討でき得るモデル動物として有用である。

【0042】

【実施例】

以下、実施例に基づいて本発明を更に具体的に説明する。

【実施例 1】組み換え遺伝子コンストラクト

ヒトグリオキサラーゼ I cDNA は、相模中央化学研究所 (神奈川、日本) より供給を受けた。ヒトグリオキサラーゼ I cDNA 導入遺伝子コンストラクトを構築するために、この cDNA を DNA Ligation Kit Ver. 2 (宝酒造) を用いて P B S C A G-2 の E c o R I サイトにクローニングした。なお、P B S C A G-2 は、P C A G G S (Niwa H et al., Gene 108: 193-200 (1991)、CMV エンハンサー及びニフトリβアクチン・プロモーター及びウサギβグロビン・ターミネーターを持つ) の S a l I-P s t I 断片を P B l u e S c r i p t I I S K (-) (Invitrogen 社) の S a l I-P s t I 部位に組み込み作製された。グリオキサラーゼ I を含む P B S C A G-2 を制限酵素 K p n I 及び S a c I により切断し、グリオキサラーゼ I cDNA を含む断片を回収、精製し、トランスジェニックマウスの作製に使用した (図 1)。

10

20

30

40

50

【0043】

【実施例2】トランスジェニックマウスの作製
インジェクションの3日前夕方にPMSC（妊馬血清ゴナトロピン）を8-20週 の雌マウス（C57BL/6）に腹腔投与し、その2日後の夕方にhCG（ヒト胎盤性ゴナトロピン）を腹腔投与した。これにつづき、8-20週 の雄マウス（C57BL/6）を1匹ずつゲージに入れ交配を開始した。交配の翌日の午前中に膣栓の検査を行い、膣栓が確認できた雌マウスを頸椎脱臼により屠殺後、輸卵管を単離し、ヒアルロニターゼ添加したWnt3+培養液に移した。実体顕微鏡下で卵を排出させ、受精卵の分離・洗浄を行った。

【0044】

10

微分干渉装置（ノマルスキー装置）付きの倒立顕微鏡に、マニピュレータを組み合わせたシステムを用い、穴あきスライドガラス上の培養液滴に5-80個の受精卵を移動し、一つの受精卵あたり約2,000コピーの上記で調製したDNA断片を含む2 PLのDNA溶液を雌性前核にマイクロインジェクションした。DNA注入が終了した卵は、卵管に移植するまで培養した。移植部位は の発生段階で異なり、1-2細胞期の は卵管内へ、8細胞期- 盤胞期の は子宮内へ移植した。

【0045】

移植操作に先立ち、レシビエントメスの黄体の活性化処理を行い、偽妊娠を誘起させた。すなわち、発情前期のメスを精管結 したオスと不妊交尾させた。移植 の出産予定日は、レシビエントメスの膣栓のついた日を第1日とし、第20日目として計算した。卵管内へ移植する場合は、1細胞期及び2細胞期の とも、ネンブータル麻酔下で偽妊娠一日目のレシビエントマウスの卵管内に実体顕微鏡下で移植した。片側卵管あたり10個程度の を移植した。子宮内に移植する場合は、体外培養によって桑実 期から 盤胞期まで発生させた を、ネンブータル麻酔下の偽妊娠を誘起しておいたレシビエントマウスの子宮内に移植した。レシビエントマウスの偽妊娠日齢は の日齢よりも1日若く計算した。外見から胎仔の数を判断し、胎仔の数が5匹以上と予想された場合は自然分娩、4匹以下ならば帝王切開を行った。生まれたマウスは、生後3-4週の間に関から離し、雌雄を分けて飼育した。

20

【0046】

【実施例3】トランスジェニックマウスの選択
生後4週 以降に尾の一部を切断し、キット（Qiagen DNaseasy tissue kit; Qiagen社）を用いてゲノムDNAを抽出した。これを鋳型にして、導入遺伝子断片のPCRによる増幅を行った。増幅には、サイトメガロウイルスエンハンサープライマー（図1のPr 1）（センス：5'-GTC GAC ATT GAT TAT TGA CTA G-3' / 配列番号：3、アンチセンス：5'-CCA TAA GGT CAT GTA CTG-3' / 配列番号：4）及びヒトグリオキサラーゼI遺伝子とベクターの3'-junctionを含む断片のためのプライマー（図1のPr 2）（センス：5'-GTA GTG TGG GTG ACT CCT CCG TTC CTT GGG-3' / 配列番号：5、アンチセンス：5'-TCG AGG GAT CTT CAT AAG AGA AGA G-3' / 配列番号：6）を用いて、PCRによる増幅産物が得られる個体を選別した。得られたF0世代6個体（雄3個体、雌3個体）を、正常個体（C57BL/6N Jcl）と交配させF1世代を得た。

30

40

【0047】

動物は、水の自由摂取の条件下、代謝ケージで飼育した。尿蛋白量を測定するための24時間尿は屠殺の1日前に、血液サンプルは屠殺時に採取した。器官のサンプルは4%の中性緩衝ホルムアルデヒドで固定化され、パラフィン包埋し、4μmに裁断後、ヘマトキシリン-エオジン（HE）またはPAS染色を施した。野生型またはヘテログリオキサラーゼIトランスジェニックF1マウスの組織（50mg）は、0.02%のトリトン-Xを含有する1mLのNaPB（pH7.0）でホモジナイズされ、4℃で20,000g×20分間、遠心分離し、上清をイムノプロットによるグリオキサラーゼI分析、

50

グリオキサラーゼ I 活性、及びカルボニル化合物抑制の評価のための組織抽出液として使用した。

【0048】

【実施例4】イムノブロット分析

トランスジェニックマウスで高発現されたヒトグリオキサラーゼ I 遺伝子産物（約24 kDa）を抗ヒトグリオキサラーゼ I 抗体を用いた組織ホモジネートのイムノブロット分析により確認した。組織から抽出された30μgのタンパク質を5分間煮沸して変性し、アクリルアミドグラジエントゲル（4-20%）を用いたSDS-PAGEにより分離後、ポリビニリデンジフルオライド（PVDF）メンブレン（Bio Rad Lab.）に転写した。メンブレンを0.05%のTween 20及び2%のウシ血清アルブミンを含有するTris緩衝液（TBS）で4℃にて一晩ブロッッキングした後、ウサギ抗ヒトグリオキサラーゼ I Ig（1μg/mL）（Ranathan S et al., Biochem. Biophys. Acta., 1182: 311-316 (1993)）を4℃にて一晩インキュベートした。メンブレンを0.05%のTween 20を含有するTBSで洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識ヤギ由来抗ウサギIgG F(ab')₂（Cappel）とインキュベートし、ニトロブルーテトラゾリウム及びXリン酸溶液（Bio Rad Lab.）を用いて発色した。対照として10%の赤血球懸濁液を用い、基準化には抗アクチン抗体（Sigma）を使用した。結果を図2に示す。ヒトグリオキサラーゼ I トランスジェニックマウスから抽出された腎及び心臓組織は野生型に比べ有意に高いグリオキサラーゼ I 発現を示した（レーン4、5、7、8）。また、グリオキサラーゼ I の発現は、検査したすべての組織において増大していた。

【0049】

【実施例5】トランスジェニックマウス組織中のグリオキサラーゼ I 活性

トランスジェニックマウス組織中のグリオキサラーゼ I 活性は、25℃で2分間によるS-D-ラクトイルGSHの生成による240nmの吸光度の増加の検出（McLeilian A et al., Mech Ageing Dev. 48: 63-71 (1989)）により測定した。結果を表1に示す。トランスジェニックマウスの2種のラインから得られた心臓、肝臓、及び腎臓組織のタンパク質抽出物のグリオキサラーゼ I 活性は、野生型に比べて有意に高かった。

【0050】

【表1】

	心臓t (Unit/g)	肝臓 (Unit/g)	腎臓 (Unit/g)	赤血球 (mUnit/ml)	血漿 (mUnit/ml)
グリオキサラーゼ ITg/+ ラインA	1096.2±134.5	237.6±51.0	242.8±10.4	0.73±0.14	0.06±0.01
グリオキサラーゼ ITg/+ ラインB	719.4±55.3	241.0±61.6	84.0±34.3	0.66±0.15	0.49±0.22
野生型	20.1±4.1	169.5±52.1	37.2±2.4	0.69±0.07	0.05±0.05

【0051】

【実施例6】トランスジェニックマウス組織のカルボニル化合物消去能

グリオキサラーゼ I トランスジェニックマウス（ラインA）の心臓由来タンパク質抽出液とGO、またはMGO溶液（100μM）を37℃、1時間インキュベートし、GO及びMGO濃度の変化を逆相高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて測定した（Miyata T. et al., J. Am. Soc. Nephrol. 11: 1719-1725 (2000)）。結果を図3に示す。トランスジェニックマウス由来の心臓組織抽出液は、野生型に比べて、GO及びMGO濃度を有意に減少させた。また、この低下は、添加したGSHの量に依存していた。

【0052】

【実施例7】トランスジェニックラット

実施例1乃至3の記載に準じ、グリオキサラーゼ I トランスジェニックラットを作製した。実施例4及び実施例5の実験方法に準じ、得られたトランスジェニックラットの心臓、腎臓及び腹膜組織のタンパク質抽出液におけるグリオキサラーゼ I 発現を確認した。結果を図4乃至図6に示す。いずれの組織においても、グリオキサラーゼ I 活性は野生型に比べて有意に高かった。

また、実施例6の実験方法に準じ、トランスジェニックラット心臓組織のカルボニル化合物消去能を検討した。結果を図7及び図8に示す。トランスジェニックラット由来の心臓組織タンパク質抽出液は、野生型に比べて、GO（図7A）及びMGO濃度（図7B）を有意に減少させた。また、この低下は、添加したGSHの量に依存していた。

10

【0053】

【発明の効果】

本発明によりヒトグリオキサラーゼ I 遺伝子の導入によるカルボニルストレス耐性トランスジェニック動物が提供された。本発明のトランスジェニック動物を用いて、カルボニルストレスに対する生体適応機構の解明やそれに基づく創薬デザインが可能になる。

【0054】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Tokai University Educational System

Miyata, Toshio

Kurokawa, Kiyoshi

<120> Carbonyl stress resistant transgenic animal

10

<130> KRK-X0206

<140>

<141>

<160> 6

20

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 552

<212> DNA

<213> Homo sapiens

30

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(552)

<400> 1

atg gca gaa ccg cag ccc ccg tcc ggc ggc ctc acg gac gag gcc gcc 48

Met Ala Glu Pro Gln Pro Pro Ser Gly Gly Leu Thr Asp Glu Ala Ala

40

1

5

10

15

ctc agt tgc tgc tcc gac gcg gac ccc act acc aag gat ttt cta ttg 96
 Leu Ser Cys Cys Ser Asp Ala Asp Pro Thr Thr Lys Asp Phe Leu Leu
 20 25 30

cag cag acc atg cta cga gtg aag gat cct aag aag tca ctg gat ttt 144
 Gln Gln Thr Met Leu Arg Val Lys Asp Pro Lys Lys Ser Leu Asp Phe
 35 40 45

tat act aga gtt ctt gga atg acg cta atc caa aaa tgt gat ttt ccc 192
 Tyr Thr Arg Val Leu Gly Met Thr Leu Ile Gln Lys Cys Asp Phe Pro
 50 55 60

att atg aag ttt tca ctc tac ttc ttg gct tat gag gat aaa aat gac 240
 Ile Met Lys Phe Ser Leu Tyr Phe Leu Ala Tyr Glu Asp Lys Asn Asp
 65 70 75 80

atc cct aaa gaa aaa gat gaa aaa ata gcc tgg gcg ctc tcc aga aaa 288
 Ile Pro Lys Glu Lys Asp Glu Lys Ile Ala Trp Ala Leu Ser Arg Lys
 85 90 95

gct aca ctt gag ctg aca cac aat tgg ggc act gaa gat gat gcg acc 336
 Ala Thr Leu Glu Leu Thr His Asn Trp Gly Thr Glu Asp Asp Ala Thr
 100 105 110

cag agt tac cac aat ggc aat tca gac cct cga gga ttc ggt cat att 384
 Gln Ser Tyr His Asn Gly Asn Ser Asp Pro Arg Gly Phe Gly His Ile
 115 120 125

10

20

30

40

gga att gct gtt cct gat gta tac agt gct tgt aaa agg ttt gaa gaa 432
 Gly Ile Ala Val Pro Asp Val Tyr Ser Ala Cys Lys Arg Phe Glu Glu
 130 135 140

ctg gga gtc aaa ttt gtg aag aaa cct gat gat ggt aaa atg aaa ggc 480
 Leu Gly Val Lys Phe Val Lys Lys Pro Asp Asp Gly Lys Met Lys Gly
 145 150 155 160

10

ctg gca ttt att caa gat cct gat ggc tac tgg att gaa att ttg aat 528
 Leu Ala Phe Ile Gln Asp Pro Asp Gly Tyr Trp Ile Glu Ile Leu Asn
 165 170 175

cct aac aaa atg gca acc tta atg 552
 Pro Asn Lys Met Ala Thr Leu Met
 180

20

<210> 2

<211> 184

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

<400> 2

Met Ala Glu Pro Gln Pro Pro Ser Gly Gly Leu Thr Asp Glu Ala Ala
 1 5 10 15

Leu Ser Cys Cys Ser Asp Ala Asp Pro Thr Thr Lys Asp Phe Leu Leu
 20 25 30

40

Gln Gln Thr Met Leu Arg Val Lys Asp Pro Lys Lys Ser Leu Asp Phe

35	40	45	
Tyr Thr Arg Val Leu Gly Met Thr Leu Ile Gln Lys Cys Asp Phe Pro			
50	55	60	
Ile Met Lys Phe Ser Leu Tyr Phe Leu Ala Tyr Glu Asp Lys Asn Asp			
65	70	75	80
			10
Ile Pro Lys Glu Lys Asp Glu Lys Ile Ala Trp Ala Leu Ser Arg Lys			
85	90	95	
Ala Thr Leu Glu Leu Thr His Asn Trp Gly Thr Glu Asp Asp Ala Thr			
100	105	110	
			20
Gln Ser Tyr His Asn Gly Asn Ser Asp Pro Arg Gly Phe Gly His Ile			
115	120	125	
Gly Ile Ala Val Pro Asp Val Tyr Ser Ala Cys Lys Arg Phe Glu Glu			
130	135	140	
Leu Gly Val Lys Phe Val Lys Lys Pro Asp Asp Gly Lys Met Lys Gly			
145	150	155	160
			30
Leu Ala Phe Ile Gln Asp Pro Asp Gly Tyr Trp Ile Glu Ile Leu Asn			
165	170	175	
Pro Asn Lys Met Ala Thr Leu Met			
180			40

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

10

<400> 3

gtcgacattg attattgact ag

22

<210> 4

20

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

30

<400> 4

ccataaggct atgtactg

18

<210> 5

<211> 30

40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 5

gtagtgtggg tgactcctcc gttccttggg

30

10

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 6

tcgagggatc ttcataagag aagag

25

30

【 0 0 5 5 】

【 図面の簡単な説明 】

【 図 1 】 グリオキサラーゼ I 導入遺伝子コンストラクトから切り出し抽出された卵へのマイクロインジェクションに用いた DNA 断片の構造を示す図。

【 図 2 】 グリオキサラーゼ I 遺伝子産物のイムノブロット分析を示す図。レーン 1 : 10 % マウス赤血球懸濁液 (対照) 、レーン 2 : 10 % ヒト赤血球懸濁液 (対照) 、レーン 3 : 野生型マウス腎臓、レーン 4 及び 5 : F1 グリオキサラーゼ I トランスジェニックマウス (ライン A 及び B) 腎臓、レーン 6 : 野生型マウス心臓、レーン 7 及び 8 : F1 グリオキサラーゼ I トランスジェニックマウス (ライン A 及び B) 心臓。

40

【 図 3 】 トランスジェニックマウス組織中のカルボニル化合物消去能を示す図。野生型マウスの心臓由来組織タンパク質抽出液 (最終グリオキサラーゼ I 活性 : 0 . 4 u n i t / m L) 及びヒトグリオキサラーゼ I トランスジェニックマウスの心臓由来組織タンパク質抽出液 (ライン A : 最終グリオキサラーゼ I 活性 : 1 1 . 6 u n i t / m L) を 1 0 0 μ M の G O または M G O と 3 7 ° C で 1 時間インキュベートし、キノキサリン誘導体化後、H P L C 分析した。G S H を含有しない反応混合物を対照とした。クローズドバーは野生型マウス、オープンバーはグリオキサラーゼ I トランスジェニックマウスの組織を示す。* P < 0 . 0 5 、 ** P < 0 . 0 1 。

【 図 4 】 トランスジェニックラット心臓組織由来タンパク質抽出液のグリオキサラーゼ I 活性を示す図。

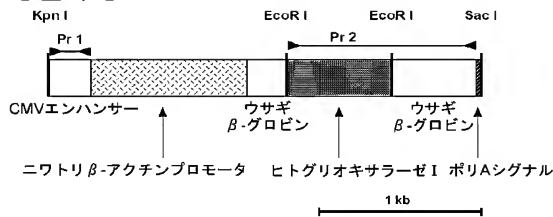
50

【図5】トランスジェニックラット腎臓組織由来タンパク質抽出液のグリオキサラーゼ I 活性を示す図。

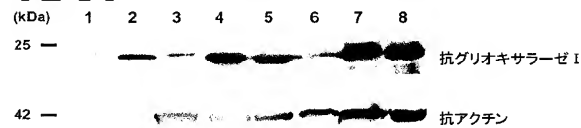
【図6】トランスジェニックラット腹膜組織由来タンパク質抽出液のグリオキサラーゼ I 活性を示す図。

【図7】トランスジェニックラット心臓組織由来タンパク質抽出液のGO消去能(A)及びMGO消去能(B)を示す図。

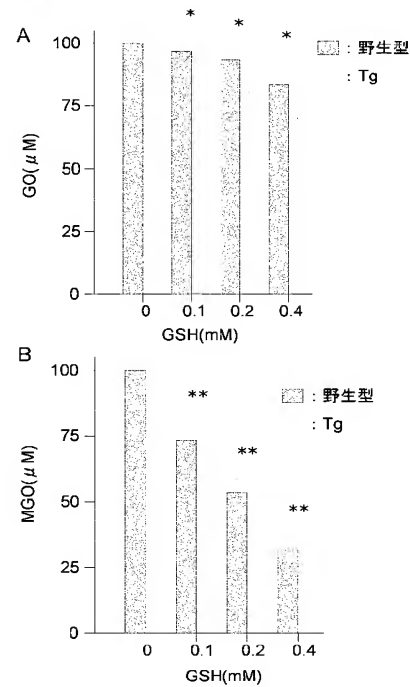
【図1】



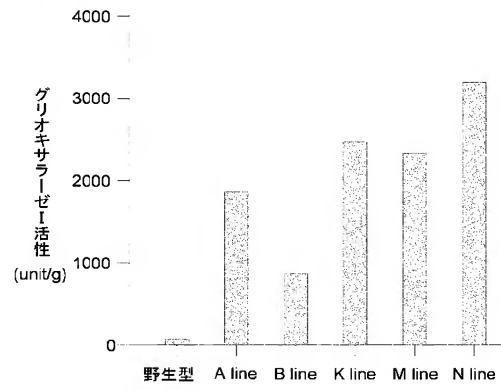
【図2】



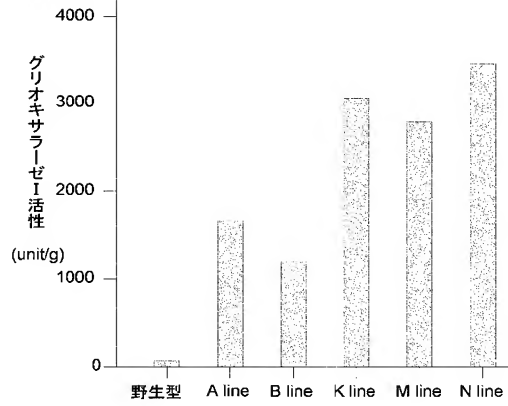
【図3】



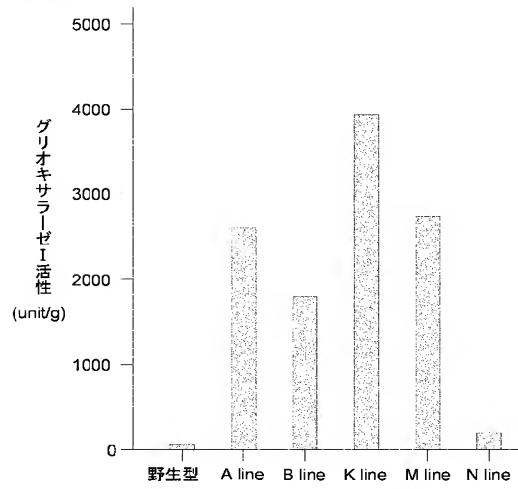
【図 4】



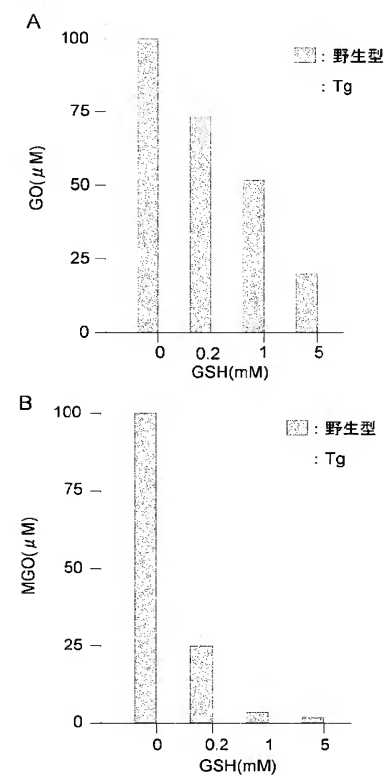
【図 5】



【図 6】



【図 7】



フロントページの続き

- (72)発明者 宮田 敏男
神奈川県伊勢原市桜台2丁目16-25 エクセル伊勢原102号
- (72)発明者 黒川 清
東京都新宿区市谷柳町49市ヶ谷ヒルズ401号
- (72)発明者 稲城 玲子
神奈川県伊勢原市上粕屋383-1-307
- (72)発明者 南学 正臣
東京都文京区大塚3-3-14-1501
- (72)発明者 上田 裕彦
大阪府大阪狭山市東野東1-507-7
- (72)発明者 吉野 淳
神奈川県中郡大磯町石神台1-15-12
- (72)発明者 チャールズ パニパーセルデ ストリホー
21アベニュー デラビエーション ブリュッセル ベルギー国
- Fターム(参考) 4B024 AA11 BA07 CA04 DA02 GA11 HA12